

# Études immunologiques sur les trypanosomoses

## I. - Existence d'un type antigénique de base chez une souche de *Trypanosoma congolense* Broden, 1904 - Variations après transmission cyclique

par G. UILENBERG (\*) et M. GIRET (\*)

### RESUME

Des expériences faites avec des moutons, des lapins, des souris et des *Glossina m. morsitans*, et utilisant un test de neutralisation, ont permis de démontrer l'existence chez une souche de *Trypanosoma congolense* d'un type antigénique de base, réapparaissant après chaque transmission cyclique. Ce type de base est obtenu par la subinoculation à des souris de sang des moutons prélevé pendant le court accès thermique précédant la première parasitémie apparente au microscope, tandis que le type antigénique de la première parasitémie apparente n'est déjà plus le même et varie de mouton à mouton. Le type isolé lors de l'apparition au microscope des parasites chez la souris inoculée avec des trypanosomes métacycliques ne correspond pas non plus au type antigénique de base. Il varie de souris à souris.

Quelques observations sont données sur les variations antigéniques au cours de l'infection chez les moutons et sur la persistance des anticorps contre le type antigénique de base; le taux de ces anticorps peut rester élevé pendant au moins 7 mois.

### INTRODUCTION

Il est actuellement connu qu'il est parfaitement possible d'immuniser des animaux contre l'infection par des trypanosomes d'un type antigénique donné. Le fait que les trypanosomes subissent des variations antigéniques au cours de l'infection et qu'il existe différentes souches d'une même espèce ont jusqu'ici empêché la mise au point d'une méthode d'immunisation valable sur le terrain.

Après les premiers travaux de BROOM et BROWN (1940), un grand pas en avant a été fait par GRAY [1962 (7), 1963, (cité par GRAY, 1964) (8), 1964 et 1965 (9)]. Etudiant

*T. brucei*, et utilisant un test d'agglutination pour la mise en évidence des anticorps, il démontre que, pour une souche donnée, la première population de trypanosomes apparaissant après chaque transmission cyclique possède toujours au moins un même antigène, même si les trypanosomes ingérés par les glossines ne le possédaient pas. Le type antigénique (\*\*) semble avoir tendance à retourner chez la glossine à un « type de base », caractéristique pour la souche. Il montre aussi (GRAY, 1966) (11) qu'il existe des souches avec des « types de base » différents. CUNNINGHAM et GRAINGE (1966) (4) utilisant un test de neutralisation, arrivent à des conclusions sem-

(\*) Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 10, rue Pierre Curie, 94 Maisons-Alfort, France.

(\*\*) La structure antigénique des trypanosomes étant certainement complexe, nous préférons parler de type antigénique, plutôt que d'un antigène.

blables pour une souche de *T. brucei rhodesiense*.

WILSON (1968) (29) et WILSON et CUNNINGHAM (1970) (31) essayent pour la première fois de démontrer l'existence d'un type antigénique de base chez une souche de *T. congolense*, mais n'y parviennent pas; ils utilisent un test de neutralisation.

Le meilleur espoir pour l'immunisation sur le terrain nous semble résider dans l'utilisation des types antigéniques injectés par le vecteur naturel, en l'occurrence la glossine (en ne considérant pas pour l'instant la trypanosomose transmise « mécaniquement » par d'autres insectes piqueurs). Les chances d'aboutir diminuent considérablement s'il n'existe pas de type de base de chaque souche, car le nombre de souches différentes dans une région serait encore multiplié par le nombre des types antigéniques de chaque souche. Malgré les échecs enregistrés par les chercheurs en Afrique de l'Est, nous nous sommes donc attachés en premier lieu à la recherche d'un éventuel type de base chez une souche donnée de *T. congolense*. Un résumé des premiers résultats a été donné récemment (UILENBERG et GIRET, 1971) (20).

## MATERIEL ET METHODES

### La souche de *T. congolense* utilisée

Il s'agit d'une souche entretenue au laboratoire depuis 1967, originaire d'Ouganda (stabilat EATRO 325), isolée de *Glossina pallidipes*. Elle a subi de nombreux passages directs et cycliques au laboratoire (voir MAILLOT, 1970) (15) et est encore transmissible par les glossines (chez *G.m. morsitans* et *G. austeni* nous avons obtenu, 4 à 5 semaines après le repas infectant, des taux d'infection de la trompe d'environ 5 p. 100, moyenne basée sur près de 400 mouches disséquées).

La souche, inoculée par la voie intrapéritonéale, s'est montrée très infectieuse pour la souris blanche, et l'incubation parasitaire lors de doses massives de formes sanguines peut n'être que de 24 heures, tandis que l'incubation avec les doses les plus faibles n'a pas dépassé 14 jours. A partir du moment où les trypanosomes font leur apparition dans le sang, la parasitémie monte rapidement, et dans l'espace de 2 à 4 jours le nombre dépasse chez la quasi-

totalité des souris 25 millions de trypanosomes par ml (dans le sang de la queue). Il atteint ensuite des valeurs beaucoup plus élevées chez la plupart des sujets, qui meurent à l'acmé de ce premier accès ou bien montrent une intermission suivie d'une ou de plusieurs rechutes; une intermission se produit rarement avant que la parasitémie ait au moins atteint 30 millions de trypanosomes par ml.

### Les glossines utilisées

Il s'agit de *G.m. morsitans*, en provenance de l'élevage du Service d'Entomologie; la souche est originaire de Rhodésie (ITARD et MAILLOT, 1966) (13).

### Animaux d'expérience et transmissions cycliques

Nous avons travaillé avec des moutons (de races européennes), afin de nous rapprocher le plus possible des conditions de la pratique, et d'obtenir fréquemment des quantités importantes de sang.

Six moutons (désignés M 1, M 2, M 3, M 4, M 5 et M 6) ont été infectés cycliquement (voir le tableau n° I). Les lots de glossines utilisés avaient été infectés sur des animaux (lapins ou moutons), en général porteurs depuis au moins un mois, pour que le variant antigénique ingéré par la mouche ne soit plus celui ayant infecté le donneur. Les lots de glossines comptaient d'environ 100 à 250 individus. Tous les moutons ont été infectés par un seul repas des glossines, afin que le jour de l'infection soit connu avec certitude. Notons encore que nous avons exposé les glossines à l'infection lors de leur premier repas après l'éclosion, pour tenter d'avoir les meilleures chances de succès [bien que HARLEY, 1969 (12), WARD et BELL, 1971 (27), n'aient pas pu démontrer une influence de l'âge de la mouche lors du repas infectant sur le taux d'infection par *T. congolense*, à l'opposé de ce qui est connu pour les trypanosomes du groupe *brucei*].

La température des moutons a été prise quotidiennement, et leur sang examiné chaque jour au microscope (goutte épaisse). Chez un des sujets (M 3) nous avons pris tous les jours du sérum, dès le lendemain de l'infection, ainsi que du sang pour inoculer à des souris afin de multiplier les trypanosomes d'un type antigénique donné (voir « La réaction sérologique »), et cela pendant un mois. Ainsi, nous avons pu

obtenir tous les types antigéniques et tous les types d'anticorps qui pouvaient apparaître chez le mouton pendant ce mois; en même temps l'inoculation aux souris met mieux en évidence la présence de trypanosomes chez le mouton que le seul examen microscopique d'une goutte épaisse. Chez les autres moutons, des injections aux souris ont été faites moins systématiquement; nous l'avons fait au moins dès que la température s'élevait. Du sérum de ces moutons a été récolté au moins une fois par semaine.

Tous les moutons ont été traités à l'acéturate de diminazine (Berenil, N.D.) après une période variant de 3 à 6 semaines suivant l'infection (voir les tableaux n°s III et IV); tous ont été guéris par une dose de 10 mg/kg, ce qui a été vérifié par des inoculations de sang à des souris, l'examen du sang au microscope et la prise de la température.

Nous avons également voulu tester les types antigéniques apparaissant chez des souris inoculées avec des trypanosomes métacycliques (méthode de WILSON et CUNNINGHAM, 1970). Des lots de glossines infectées ont été nourris *in vitro* sur du sang défibriné d'un mouton neuf (méthode de nourriture artificielle utilisée par le Service d'Entomologie). Ce sang fut aussitôt inoculé à des souris (1 ml par souris, par voie intrapéritonéale). D'autres souris encore ont directement reçu en inoculation l'appareil buccal d'une ou de plusieurs de ces mouches infectées. (Voir le tableau des transmissions, n° I.) Les types obtenus pendant la montée de la première parasitémie apparente ont été testés; ils sont désignés dans les tableaux par des chiffres romains.

Les souris blanches provenaient d'un élevage commercial.

### La réaction sérologique

Nous avons choisi une réaction de neutralisation, afin de mettre en évidence les anticorps agissant sur la vitalité des trypanosomes, les anticorps intervenant dans certaines autres réactions sérologiques n'ayant pas toujours un rapport avec l'immunité et ne mettant pas nécessairement en évidence les variations antigéniques qui nous intéressent. On sait depuis les travaux de BROWN et WILLIAMSON (1964) (3) et de WATKINS (1964) que les anticorps agglutinants sont probablement identiques aux anticorps protecteurs ou neutralisants, mais aucune méthode satisfaisante

d'agglutination n'a encore été mise au point pour *T. congolense*, et nos quelques essais ont également échoué.

Nous avons utilisé une méthode de neutralisation basée partiellement sur celle décrite par CUNNINGHAM et VAN HOEVE (1963) (5). Son principe est le suivant : du sang contenant les trypanosomes à tester est mis en contact *in vitro* avec le sérum à expérimenter et le mélange est ensuite injecté à des souris, dont le sang est régulièrement examiné pour déceler la présence de trypanosomes, afin de déterminer s'il y a eu neutralisation ou non. Notre méthode présente toutefois d'importantes différences avec celle de CUNNINGHAM et VAN HOEVE, et sur certains points se rapproche plus de celle décrite par SOLTYS (1957) (19).

L'antigène (trypanosomes vivants) pour les tests est obtenu de la façon suivante :

Du sang du mouton infecté est inoculé par voie intrapéritonéale à des souris (\*) (3 souris, 1 ml de sang sur héparine chacune). (Il est évidemment possible d'utiliser directement le sang des moutons pour les tests, sans passer par la souris, mais la parasitémie est très variable et celle du sang veineux atteint rarement le degré nécessaire aux tests.) Les souris sont examinées quotidiennement, et leur sang est prélevé en pipette (sur héparine), dans le sinus veineux rétro-orbitaire, dès que la parasitémie monte à environ 1 million à 1,5 million de trypanosomes par ml [de sang rétro-orbitaire (\*\*)]. Il est important de bien surveiller la montée de la parasitémie et de prélever le sang avant l'acmé du premier accès, afin d'éviter la possibilité de variations antigéniques chez la souris; il est d'ailleurs rare qu'une intermission se produise avant que le sang rétro-orbitaire contienne au moins 10 millions de trypanosomes par ml (\*\*\*). Une certaine variation du nombre est inévitable, malgré la surveillance quotidienne; des parasitémies d'environ 0,5 à 2 millions de trypanosomes sont encore utili-

(\*) Toutes nos inoculations aux souris sont faites par voie intrapéritonéale.

(\*\*) Notons que la parasitémie du sang rétro-orbitaire est toujours beaucoup moins élevée que celle du sang prélevé à la queue.

(\*\*\*) La surveillance de la montée de la parasitémie dès le début permet également d'éviter l'emploi des rares souris avec une montée lente ou irrégulière, où on peut craindre une variation antigénique avant le prélèvement.

sables pour les tests; si le nombre est plus faible, l'infectiosité du sang n'est pas assez grande, elle est trop élevée dans le cas contraire.

Le sang des souris inoculées directement avec des trypanosomes métacycliques est prélevé de la même façon, pendant la montée de la parasitémie.

Le sang ainsi prélevé a presque toujours été congelé et stocké dans de l'azote liquide; les stabilats obtenus sont décongelés au fur et à mesure des besoins. Dans quelques cas, des tests ont été faits avec du sang frais d'une souris ayant une parasitémie convenable du type antigénique à tester. Quelquefois un second stabilat a été fait via un passage sur souris du premier, soit pour obtenir plus de matériel du type en question, soit pour arriver à un stabilat avec une parasitémie mieux adaptée aux besoins des tests que le premier (\*). Nous n'avons jamais fait plus d'un seul passage supplémentaire, cela afin d'écarter la possibilité de voir apparaître des variations antigéniques. Nous n'avons d'ailleurs, pour la même raison, utilisé cette procédure que lorsque la parasitémie atteignait le degré nécessaire en une semaine ou moins après le passage.

Pour la congélation du sang prélevé, du glycérol est ajouté, jusqu'à 10 p. 100 du volume total, et bien mélangé. Des capillaires de verre (de 2 mm de diamètre intérieur et de 10 cm de long) sont remplis et scellés à la flamme; le sang est ensuite lentement congelé de la façon suivante : chaque lot de capillaires est placé dans un tube en plastique, entouré d'un cylindre de carton; le tout est introduit dans un tube de verre épais, se trouvant dans un mélange de glace carbonique et d'alcool, à l'intérieur d'une boîte isotherme. Après une heure de congélation, le tube en plastique avec les capillaires est stocké dans de l'azote liquide. La décongélation est faite rapidement, en plongeant le capillaire dans de l'eau à 38 - 40 ° C. Dans ces conditions la survie des trypanosomes est excellente et la mortalité semble négligeable jusqu'à au moins un an après la congélation. En effet, le nombre de trypanosomes mobiles avant et après la congélation est sensiblement le même, ainsi que leur infectiosité, étant donné que des nombres comparables avant et après la

congélation ont des périodes d'incubation semblables après inoculation à la souris.

*Les sérums* sont obtenus par coagulation de sang; ils sont séparés du caillot le lendemain du prélèvement, et stockés dans des ampoules scellées, sans produit conservateur, à environ — 20° C.

*La réaction est pratiquée* de la façon suivante :

0,05 ml de sang contenant les trypanosomes du type antigénique à tester est mis dans 1 ml du sérum à expérimenter; le tube se trouve dans un bain de glace, à 0° C. Le sérum est non dilué et il est inutile de le chauffer, les résultats des tests étant identiques avec des sérums inactivés à 56° ou non. Une suspension homogène du sang dans le sérum est faite *immédiatement* (\*\*), et le tout est à nouveau mélangé toutes les 15 minutes; d'éventuelles bulles d'air sont enlevées. Après 45 minutes (\*\*\*) on inocule 6 souris, à raison de 0,1 ml du mélange par animal, par voie intrapéritonéale. (Bien que la statistique n'ait qu'une valeur relative dans des expériences utilisant un matériel biologique plus ou moins variable (\*\*\*\*), le nombre de 6 souris a été adopté, la différence entre un résultat de 6 sur 6 et de 0 sur 6 étant statistiquement significative, alors que celle entre 5 sur 5 et 0 sur 5 est à la limite d'être significative.) L'infectiosité de stabilats ayant le même niveau de parasitémie s'est montrée sensiblement la même pour les différents stabilats (sans doute puisque chaque type a été prélevé chez les souris au même stade, pendant la montée de la parasitémie). Néanmoins, et étant donné qu'il n'a pas été possible d'éviter un certain degré de variation numérique entre différents stabilats (voir plus haut), l'infectiosité du sang est toujours vérifiée par un test témoin sur 6 souris, utilisant le même sang, mais du sérum négatif, prélevé avant l'infection du mouton. Le sang de la queue de ces 6 souris témoins est exa-

(\*\*) Par rotation entre les mains. Ajoutons que les petits détails de l'exécution du test ont leur importance, ainsi que nous avons pu le constater lors d'expériences préliminaires pour la mise au point de la méthode.

(\*\*\*) Des expériences préliminaires ont indiqué que, pour notre méthode, une neutralisation pendant 45 mn semble donner des résultats plus nets que la période de 30 mn adoptée par les chercheurs de l'E.A.T.R.O.

(\*\*\*\*) Par exemple, SIMMONS et collab., 1963 (18) ont trouvé que chez plus de 10 p. 100 de souris inoculées par voie intrapéritonéale par un technicien expérimenté, le matériel injecté avait en partie ou en totalité été déposé hors du péritoine.

(\*) Malgré la surveillance quotidienne, la parasitémie se montre parfois trop élevée ou trop basse au moment du prélèvement.

miné quotidiennement entre lame et lamelle (40 champs, grossissement  $6 \times 40$ ), jusqu'à ce qu'elles deviennent positives, ce qui se produit habituellement de 4 à 6 jours après l'injection avec les nombres de trypanosomes normalement utilisés (voir plus haut). Toutes les souris sont alors examinées jusqu'à ce que des trypanosomes apparaissent dans le sang ou jusqu'à 14 jours après l'injection au cas où elles restent négatives (\*). Si les souris inoculées avec le mélange à tester deviennent positives en même temps que les témoins, le sérum ne contient pas d'anticorps neutralisants, décelables par notre méthode, contre le type du stabilat utilisé. Au cas où toutes les 6 souris restent négatives, et les témoins montrent que l'infectiosité du sang est normale, nous appelons la neutralisation complète (dans les limites de la méthode adoptée); tous les 6 témoins doivent être positifs en 7 jours ou moins, sinon le test est répété, éventuellement avec un meilleur stabilat obtenu après un passage. Les résultats peuvent être intermédiaires, une certaine proportion des souris, ou même toutes les 6, peuvent devenir positives, mais avec un retard net par rapport aux témoins; la neutralisation est partielle.

Tout test donnant un résultat incertain (par exemple par la mort de souris) est répété. De nombreux tests ont en outre été répétés pour vérifier la validité des résultats et ils se sont montrés très reproductibles. Quelques tests enfin ont été répétés avec des stabilats contenant de 5 à 15 millions de trypanosomes/ml, afin d'avoir une idée du taux comparatif de certains anticorps dans différents sérums. Dans ces cas, certains sérums, qui neutralisent normalement complètement, ne le font plus que partiellement. D'autres au contraire continuent à neutraliser complètement, bien que les témoins soient alors tous positifs après 3 ou 4 jours. Il peut, dans ces cas, être impossible de mettre en évidence une action de sérums qui normalement donnent une neutralisation partielle.

### Interprétation des résultats des tests

La procédure utilisant des témoins pour vérifier, et déterminer selon la période d'incubation,

---

(\*) Des expériences préliminaires ont indiqué que l'inoculation de la dose infectieuse minimale de la souche ne semble pas dépasser 14 jours (ce qui n'est sans doute pas toujours valable pour d'autres souches). Ajoutons que la période d'incubation observée chez les très nombreuses souris utilisées pour les tests a exceptionnellement atteint 13 jours, une seule fois 14.

l'infectiosité du sang de chaque tube capillaire, nous semble mieux adaptée à notre méthode, plus simple, et au moins aussi précise pour cette souche, avec un comportement si régulier chez la souris, que le titrage de l'infectiosité de chaque stabilat une fois pour toutes, suivant la méthode de LUMSDEN et collab. (1963) (14).

Notre méthode permet de déterminer, à partir d'un certain seuil de détection, la présence ou l'absence d'anticorps neutralisants contre le type antigénique du stabilat expérimenté. Une détermination quantitative plus fine que la neutralisation complète, neutralisation partielle ou absence de neutralisation n'a pas été cherchée jusqu'ici, mis à part quelques tests faits avec des stabilats d'une infectiosité plus élevée que la normale (voir ci-dessus). Cela serait sans doute possible, également par des dilutions des sérums, mais le nombre nécessaire de souris, déjà élevé étant donné les très nombreux stabilats et sérums expérimentés, serait multiplié à un tel point que nous avons dû y renoncer. Il serait souhaitable de pouvoir utiliser une méthode mettant les mêmes anticorps en évidence, qui permette de les déterminer quantitativement et qui puisse être rapidement effectuée *in vitro*, évitant l'emploi onéreux de grands nombres de souris et la longue période d'observation qu'elles exigent. En attendant, nous devons nous contenter de cette méthode de neutralisation qui, bien que moins précise, rend néanmoins des services importants.

Les résultats donnés ne sont valables que dans les limites de la méthode indiquée ci-dessus. La distinction entre les trois réponses différentes possibles est d'ailleurs quelque peu arbitraire, car elle dépend en grande partie de l'infectiosité du sang utilisé, que nous avons donc essayé de standardiser le plus possible. Il n'y a, en fait, aucune différence réelle entre des cas marginaux, par exemple entre un test où une ou deux souris deviennent positives vers la fin de la période d'observation (neutralisation partielle) et un autre où toutes les souris restent négatives (neutralisation complète). S'il avait été possible d'utiliser plus de six souris par test, la précision des résultats aurait été augmentée. Toutefois, la répétition de nombreux tests a confirmé les résultats de façon remarquable.

Une neutralisation partielle peut soit indiquer que le taux des anticorps spécifiques contre le type du stabilat testé est faible, soit que le type antigénique du stabilat est apparenté, mais non



identique, au type ayant provoqué la formation des anticorps. Cela n'est pas une hypothèse, les résultats montrent des exemples des deux cas.

## RESULTATS

### Evolution chez les moutons

La température de quatre des moutons a commencé à s'élever au-dessus de la normale 7 jours après le repas des glossines, chez un autre après 8 jours, et chez le 6<sup>e</sup> après 10 jours. La durée de cette première hyperthermie a été de 3 jours dans 4 cas, de 2 jours dans un autre cas, et de un jour seulement dans le sixième. Son maximum variait selon l'individu de 40° à 41,9° C. Elle a été suivie d'une période de 3 à 6 jours, pendant laquelle la température restait normale, chez les 6 sujets; ce n'est qu'ensuite qu'elle s'est élevée de nouveau, soit 12 à 16 jours après l'infection.

Aucun trypanosome n'a pu être détecté au microscope au cours de cette première courte période d'hyperthermie chez 5 des animaux; un trypanosome a été observé une seule fois dans une goutte épaisse du sixième mouton.

Le début d'une parasitémie apparente au microscope correspondait chez chaque animal approximativement au début de la deuxième période d'hyperthermie, et commençait entre 13 et 17 jours après l'infection.

Le sang était infectieux pour la souris pendant la première période d'hyperthermie. La parasitémie était très faible, ce qui se reflétait, outre qu'elle était latente au microscope, par une longue période d'incubation chez la souris [de 7 à 13 jours, en moyenne 9 (\*)] et par le fait que toutes les souris ne devenaient pas toujours toutes positives. Le sang de deux moutons a été inoculé aux souris quotidiennement dès le lendemain de l'infection; il était infectieux dans un cas à partir du 6<sup>e</sup> jour, un jour avant l'hyperthermie, dans l'autre à partir du 8<sup>e</sup>, qui était le second jour de l'hyperthermie. Le sang de trois autres moutons était infectieux tout au moins le 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> jour. Des souris ont été inoculées avec le sang du 6<sup>e</sup> sujet (dont l'hyperthermie n'avait commencé qu'après 10 jours),

6, 8 et 10 jours après l'infection; seules celles inoculées le 10<sup>e</sup> jour sont devenues positives.

Ensuite, pendant la période entre les deux vagues d'hyperthermie, le sang n'était pas infectieux ou très faiblement (vérifié chez 4 des 6 moutons).

A partir du début de la première parasitémie apparente au microscope, correspondant à la seconde hyperthermie, le sang de tous les moutons était constamment très infectieux jusqu'au traitement au Berenil, et l'incubation chez les souris n'était souvent que de 3 jours, parfois de 2.

Le tableau n° II donne, comme exemple, l'évolution chez le mouton M 3.

Notons encore qu'aucun des moutons n'a accusé l'infection par une maladie cliniquement apparente pendant une période d'observation de 3 à 6 semaines. Ils ont tout au plus légèrement maigri avec parfois une respiration accélérée, mais l'appétit était presque toujours conservé.

### Types antigéniques obtenus chez les moutons (tableaux nos 3 et 4)

Les deux tableaux montrent que le type de l'accès latent des moutons M 2, M 3, M 4, M 5 et M 6 (\*\*), n'est en aucun cas le même que celui du premier accès apparent.

Ils démontrent également que les types de l'accès latent chez les 5 moutons où des stabilats ont été faits pendant cette période, sont soit identiques, soit en possession des antigènes importants communs. Les sérums des jours 17 à 21 du mouton M 3, qui ne neutralisent que partiellement ou pas du tout des stabilats du premier accès apparent de chaque mouton, neutralisent complètement ceux de l'accès latent. Quelques résultats indiqués dans le tableau IV, avec les sérums des autres moutons, confirment l'identité antigénique des types de l'accès latent (\*\*\*). Le tableau IV apporte

(\*\*) Un stabilat n'a malheureusement pas été fait du type de l'accès latent chez le mouton M 1, premier mouton expérimenté à un moment où nous ne réalisions pas l'importance de cet accès.

(\*\*\*) Nous avons dû tâtonner au début pour connaître les propriétés de chaque sérum envers les différents stabilats et, rétrospectivement, certains tests auraient avantageusement été remplacés par d'autres combinaisons de stabilats et sérums, qui paraissent maintenant plus logiques. Pour des raisons de temps, nous avons dû renoncer à d'autres tests; de plus, le stock de certains sérums était épuisé.

(\*) Chez 37 souris positives, l'incubation était 7 fois de 7 jours, 8 fois de 8 j, 9 fois de 9 j, 7 fois de 10 j, 3 fois de 11 j, 2 fois de 12 j et une fois de 13 j.

aussi la preuve que les sérums du mouton M 1 contiennent des anticorps contre le type de l'accès latent des autres moutons, et indique indirectement l'existence de ce type chez M 1 également.

L'existence d'un type de base de *T. congolense* est ainsi démontrée. Pourtant, les types antigéniques des trypanosomes ayant infecté les glossines n'ont certainement pas été du type de base. En effet la durée de l'infection chez le lapin et les moutons, avant de transmettre ces trypanosomes aux mouches (tableau n° I), a été si longue que de nombreuses variations antigéniques ont pu se produire (voir aussi, ci-dessous, les variations démontrées chez le mouton M 3). Une preuve précise en est d'ailleurs fournie pour le mouton M 1 : les stabilats des jours 41 et 42 ne sont pas neutralisés par le sérum du jour 28, qui neutralise complètement le type de base (les tests avec les stabilats du 41<sup>e</sup> et 42<sup>e</sup> jour ne sont pas indiqués dans les tableaux); or, les glossines ayant transmis ensuite l'infection aux moutons M 4 et M 6 ont été infectées sur M 1 respectivement le jour 42 et 41; on retrouve par la suite le type de base pendant l'accès latent des moutons M 4 et M 6.

En plus des comparaisons entre types d'accès latent et de premier accès apparent, et quelques tests non indiqués dans les tableaux, nous avons expérimenté les variations antigéniques de façon plus étendue chez le mouton M 3. Nous n'avons pas pu faire tous les tests nécessaires pour préciser les différences entre les stabilats de chaque jour, mais la lecture du tableau n° III, donnant les résultats des tests effectués, montre néanmoins une variation rapide. Le type du 11<sup>e</sup> jour semble encore le même que celui du 6<sup>e</sup> (type de base), tandis que celui du 13<sup>e</sup> est différent. Les variations se succèdent ensuite rapidement. Quelques tests avec des stabilats obtenus après le 20<sup>e</sup> jour (non indiqués dans le tableau) indiquent que les types du 24<sup>e</sup> et du 26<sup>e</sup> jour sont les mêmes ou proches l'un de l'autre, mais différents de celui du 20<sup>e</sup> jour et des stabilats le précédant, tandis que celui du 30<sup>e</sup> jour est encore différent. Il est intéressant de noter que le type antigénique peut apparemment changer au cours d'un accès parasitémique. En comparant le tableau n° III à l'évolution de M 3 montrée dans le tableau n° II, on voit que le type antigénique du jour 16, acmé du premier accès apparent, se montre différent de celui du jour 15, et ce dernier sem-

ble encore différent de celui du jour 14, le début du même accès.

Les types antigéniques du début du premier accès apparent ne sont pas identiques chez tous les moutons, comme le montrent les tableaux n°s III et IV. Il semble y avoir au moins 4 types différents; dans la limite des tests effectués, seuls les stabilats des moutons M 1 et M 4 d'une part et de M 2 et M 3 d'autre part, ne se sont pas montrés différents. Il y a certainement une tendance à ce que les sérums de tous les moutons possèdent à la fin des anticorps contre le type du premier accès apparent de chaque mouton, à l'exception notable toutefois du mouton M 5. Certains antigènes semblent donc avoir tendance à se développer chez une souche donnée à un stade précoce de l'infection [« antigènes prédominants » de GRAY, 1964 (8), 1965 (10)]. Néanmoins, l'ordre dans lequel ils apparaissent n'est pas toujours le même chez *T. congolense*.

GRAY (1962) (7) écrit que la variation antigénique des trypanosomes (*T. brucei*) est un processus graduel. Nos tableaux en donnent en effet des exemples :

Le sérum de M 5 du jour 21 neutralise entièrement le type de base (\*), mais pas du tout le type du début de l'accès apparent de M 5. Néanmoins, ce sérum neutralise partiellement les types de l'accès apparent de M 3 et M 6, qui sont donc apparentés au type de base; cela peut expliquer aussi la neutralisation partielle de ces types par les premiers sérums de M 3, qui neutralisent complètement le type de base. Il semble, en se basant sur ces données, que les types du premier accès apparent des moutons M 2, M 3 et M 6 soient apparentés au type de base, comme également certains des stabilats obtenus directement de souris inoculées avec des trypanosomes métacycliques. (Un changement graduel est peut-être également indiqué par les tests avec les stabilats des jours 14, 15 et 16 du mouton M 3.) Par contre, aucune parenté avec le type de base n'a été mise en évidence par les tests avec les types du début du premier accès apparent de M 1, M 4 et M 5, et la variation n'est donc peut-être pas toujours graduelle chez *T. congolense*.

---

(\*) Le taux d'anticorps de ce sérum est même si élevé que des stabilats contenant 10 millions de trypanosomes du type de base par ml sont encore complètement neutralisés.

### Types antigéniques obtenus chez les souris (tableaux n°s III et IV)

Aucun des 7 stabilats obtenus directement chez la souris à partir des glossines (stabilats I à VII) n'appartient au type de base obtenu des moutons, et ils sont souvent différents entre eux. Il semble y avoir au moins 5 types différents; seuls les stabilats II et IV d'une part, et les stabilats V et VII d'autre part, ne peuvent pas être différenciés sur la base des tests effectués. Notons encore que les stabilats VI et VII, différents comme le montrent les tests avec le sérum de M 3 du 20<sup>e</sup> jour, ont été obtenus de deux souris différentes, inoculées en même temps avec un lot de sang contenant des trypanosomes métacycliques d'un même lot de glossines. Le VI a eu une incubation de 8 jours et a été isolé 4 jours plus tard, l'incubation du VII a été de 10 jours et il a été isolé au 13<sup>e</sup> jour.

Les types obtenus chez les souris semblent se situer parmi ceux isolés au début de la première parasitémie apparente des moutons. D'ailleurs, l'incubation après ces injections de trypanosomes métacycliques chez les souris a été assez longue (de 8 à 12 jours) et les 7 stabilats n'ont pu être isolés que de 11 à 14 jours après les injections, quand la parasitémie atteignait le degré souhaité, période qui se rapproche de l'incubation de l'accès apparent des moutons, dont le type antigénique ne correspond pas non plus au type de base.

Il n'est donc pas possible d'obtenir le type de base d'une souche de *T. congolense* selon la méthode de Wilson.

### Apparition, taux et persistance des anticorps

Des anticorps contre le type de base ont pu être décelés chez le mouton M 3 16 jours après l'infection, soit 10 jours après que ce type a pu être isolé du sang pour la première fois. La neutralisation était déjà complète le lendemain, avec tout de suite un taux d'anticorps qui neutralise complètement des stabilats contenant au moins 5 à 10 millions de trypanosomes par ml. L'apparition des anticorps n'a pas été aussi rapide chez tous les moutons : la neutralisation du type de base est encore incomplète 21 jours après l'infection de M 4, 20 jours après celle de M 6, mais complète au 28<sup>e</sup> et 21<sup>e</sup> jour respectivement. Notons encore que nous avons pu voir que le taux d'anticorps était très élevé au 24<sup>e</sup> jour chez M 2 et au 21<sup>e</sup> jour chez M 5.

La persistance des anticorps contre le type de base a été étudiée pendant 7 mois chez le mouton M 1 (tableau n° IV). Le sérum prélevé après 210 jours le neutralise encore complètement, et le taux d'anticorps est encore si élevé que des stabilats contenant au moins 5 millions de trypanosomes par ml sont neutralisés.

Les anticorps contre les types du début de l'accès apparent sont également décelés après des périodes variables : la neutralisation est complète à partir du jour 21 chez M 3; pas de neutralisation par le sérum du jour 21 chez M 5, mais neutralisation complète au 28<sup>e</sup> jour; absence de neutralisation chez M 6 au 20<sup>e</sup> jour et neutralisation seulement partielle au 31<sup>e</sup> jour. Il y a par ailleurs neutralisation complète au 21<sup>e</sup> jour chez M 1, au 24<sup>e</sup> jour chez M 2, et au 21<sup>e</sup> jour chez M 4 (dans ce cas donc même avant la neutralisation complète du type de base). Le résultat obtenu chez le mouton M 1 (tableau n° IV) montre que des anticorps contre le stabilat du début de son premier accès apparent persistent encore après 7 mois, mais que le taux en a baissé.

Rappelons que WILSON (1971) (31) a montré que des anticorps neutralisants persistent pendant au moins 300 jours chez des bovins inoculés à deux reprises par la seringue avec *T. congolense* d'un type antigénique donné et traité chaque fois au Berenil 3 semaines après l'injection.

### Persistance du Berenil dans l'organisme

VAN HOEVE et CUNNINGHAM (1964) (21), (1964) (22) et VAN HOEVE, CUNNINGHAM et GRAINGE (1965) (23) ont démontré que l'élimination du Berenil après injection aux bovins n'est pas aussi rapide que l'on pensait et que le sérum pouvait en contenir jusqu'à 3 semaines après l'injection de 7 mg/kg et influencer des trypanosomes exposés à ce sérum *in vitro*.

L'élimination semble plus rapide chez les moutons : le sérum du mouton M 3, prélevé 6 jours après son traitement à 10 mg/kg, n'a pas neutralisé le stabilat de l'accès apparent du mouton M 6; le sérum de M 4, pris 7 jours après son traitement, ne neutralise pas les stabilats V, VI et VII. Lors d'un autre test, non indiqué dans les tableaux, le sérum de M 1, 7 jours après son traitement, n'a aucune action sur les trypanosomes. Si le Berenil persiste une semaine ou plus après le traitement, son taux



semble être si faible qu'il ne cause pas de fausses neutralisations, même partielles. Toutefois, il faut tenir compte de la possibilité que des sérums prélevés peu après le traitement au Berenil peuvent influencer les résultats des tests de neutralisation.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons exposé nos premiers résultats afin d'inciter d'autres chercheurs à ne pas abandonner tout espoir d'immuniser contre les trypanosomoses animales transmises par des glossines, étant donné qu'il nous a été possible de mettre en évidence un type de base chez une souche de *T. congolense* également, et que le taux d'anticorps contre ce type de base était encore élevé 7 mois après l'infection d'un mouton par les glossines. Les recherches ultérieures devront se porter sur la possibilité d'utiliser ce fait pour des essais de vaccination contre une souche donnée. Il sera également nécessaire de déterminer le nombre de souches ayant des types de base différents dans une région donnée, et la persistance du même type de base chez une souche donnée. Si ce nombre est trop élevé ou si le type change au cours de nombreuses transmissions, l'application pratique d'une vaccination pourrait encore être compromise.

Nos résultats obtenus chez *T. congolense* confirment ceux de GRAY chez *T. brucei*. Il a été possible de démontrer, en suivant des méthodes semblables à celles de GRAY (inoculation du sang des animaux infectés à des souris pour l'obtention des antigènes), l'existence d'un type antigénique de base après transmission cyclique.

Un accès latent, précédant la parasitémie apparente, a été mis en évidence et son importance démontrée, puisque ce n'est que pendant cet accès que l'on obtient le type de base.

Le type antigénique du premier accès apparent (au microscope) ne correspond pas au type de base. Cela peut expliquer les résultats négatifs de WILSON et CUNNINGHAM, ainsi que les nôtres lorsque nous avons utilisé leur méthode (stabilats I à VII, préparés à partir de souris inoculées directement avec des trypanosomes métacycliques), étant donné que l'on compare dans ce cas des types du premier accès *apparent*. Cet accès pourrait être précédé, comme chez les moutons, d'un accès latent de trypanosomes du type antigénique de base,

hypothèse dont la probabilité est augmentée par la longue période d'incubation observée dans ces cas (voir plus haut). Nous espérons pouvoir bientôt éprouver l'hypothèse d'un accès latent chez la souris.

Le nombre de souches différentes dans une région donnée pourrait donc bien être moins grand que ne le laissent craindre les résultats obtenus par DAR et collab. (1971) (6), qui ont utilisé pour leurs comparaisons le type antigénique du premier accès *apparent* après transmission cyclique, type dont nous avons démontré qu'il peut varier d'animal à animal pour une même souche.

Il semble intéressant de citer ici la publication de ROBERTS et collab. (1969) (16), qui signalent des réactions cutanées locales, contenant des trypanosomes, chez des bovins après transmission cyclique de *T. congolense*, réactions précédant de quelques jours la parasitémie apparente. Il serait intéressant de rechercher une relation éventuelle entre ces réactions locales et l'accès de parasitémie latente.

Comment expliquer le retour au type antigénique de base pendant l'évolution des trypanosomes chez la glossine ? GRAY (1964) (8), (1965) (9), pense que la tendance à ce retour est liée à l'absence de pression par des anticorps lors du séjour dans la glossine, et cette tendance serait « innée ». Plus vraisemblable nous semble l'explication (pour le groupe *brucei* tout au moins) de VICKERMAN (1968) (24), (1970) (25) qui, se basant sur des observations au microscope électronique, suggère que les antigènes variables sont localisés dans la couche superficielle se trouvant à l'extérieur de la membrane de surface des formes sanguines, couche qui disparaît chez la glossine et également en culture. Elle est reconstituée dans les glandes salivaires de la glossine, et serait alors du type antigénique de base de la souche, les antigènes variables, ingérés par la mouche, ayant été perdus avec la disparition de la couche superficielle. Des preuves expérimentales pour cette théorie sont, par exemple, fournies par VICKERMAN et LUCKINS (1969) (26) et BROWN et VICKERMAN (1970) (2). Il est intéressant de rappeler ici également les observations de SEED (1964) (17) qui montre que les formes de culture, qui ne possèdent pas la couche superficielle, du groupe *brucei* ne sont pas sujettes à des variations antigéniques sous l'influence d'anticorps, à l'opposé des formes sanguines.

TABLEAU N° I  
Schéma des transmissions cycliques effectuées

Lignes interrompues = transmissions effectuées avant nos recherches.  
GM = *G.m.morsitans*.

Les chiffres indiquent le nombre de jours durant lesquels l'hôte (mammifère ou glossine) a été infecté avant de transmettre l'infection à l'hôte suivant).

Le mouton M 6 a été infecté le même jour par deux lots de glossines différents (infectés *in vitro* sur des stabilats de deux moutons différents).

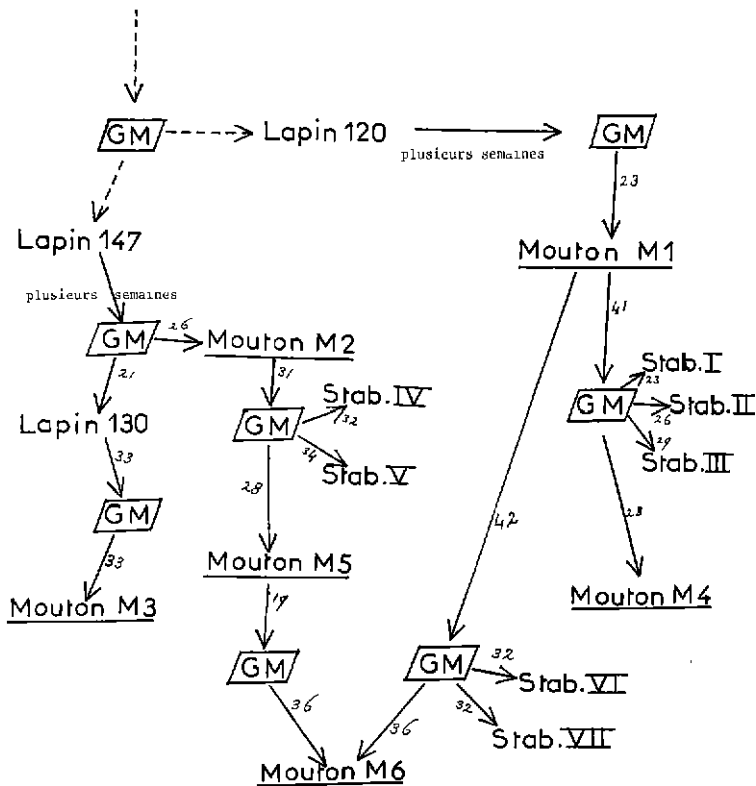


TABLEAU N° II  
Evolution chez le mouton M 3

Infectiosité = résultats des inoculations du sang du mouton aux souris, avec durée de l'incubation chez la souris en jours.

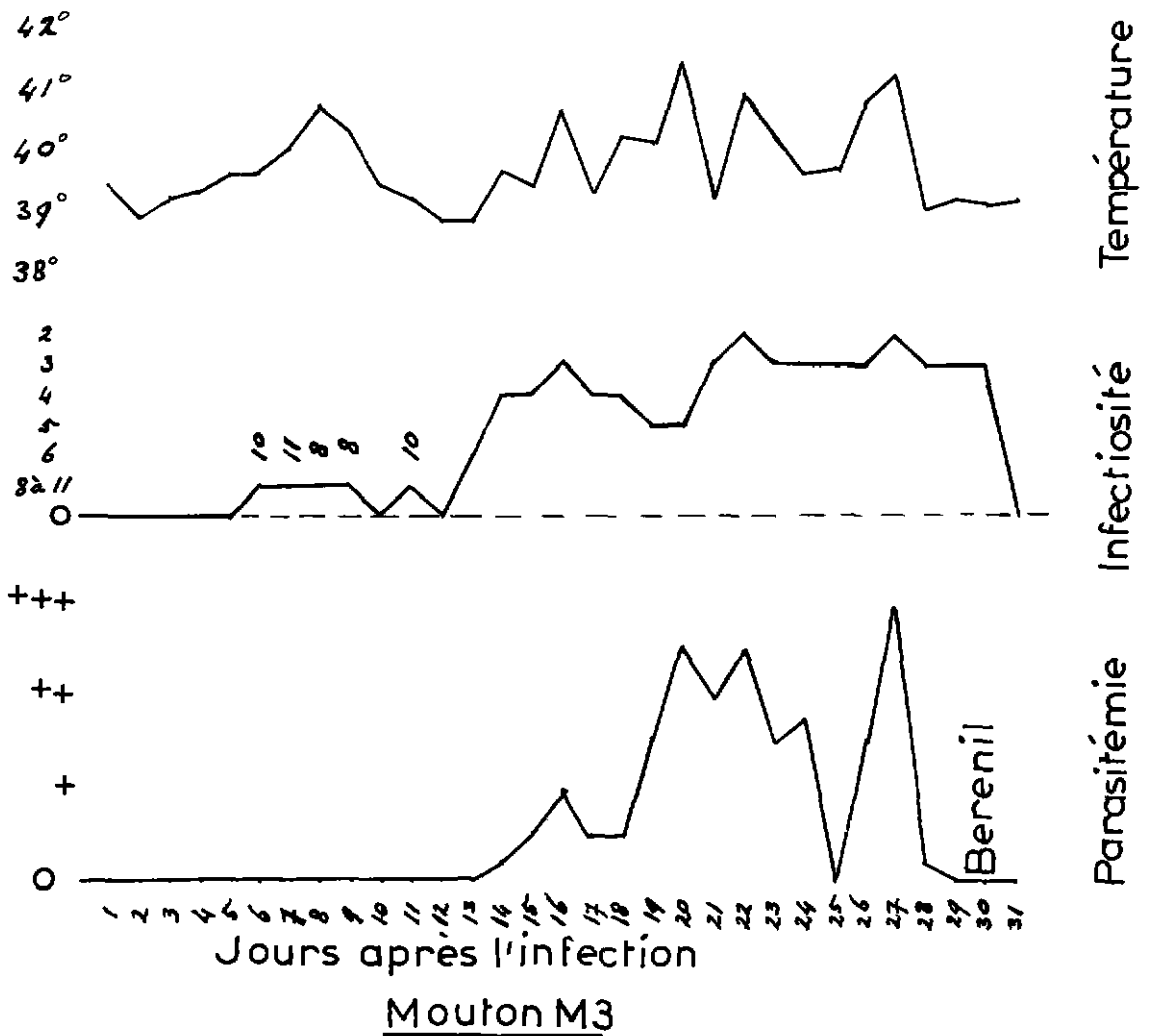
Parasitémie = nombre de trypanosomes observé au microscope.

+ = 1 parasite pour 5 champs (goutte épaisse, grossissement  $6 \times 50$ ).

++ = 1 parasite par champ.

+++ = 5 parasites par champ.

(Il s'agit de sang prélevé d'une veine auriculaire.)



TABLEAUX Nos III et IV  
Résultats des tests de neutralisation

(Le tableau 3 indique uniquement les expériences faites avec des sérums du mouton M 3.)

Les chiffres indiquent le nombre de jours après l'infection quand le sérum en question a été obtenu ou bien quand le type antigénique en question a été isolé par l'injection de sang du mouton à des souris.

Stabilats des moutons de l'accès *latent* :

M 1 = pas de stabilat fait.

M 2 = stabilat obtenu le 7<sup>e</sup> jour après l'infection, au premier jour de l'hyperthermie.

M 3 = stabilat du 6<sup>e</sup> jour, un jour avant l'hyperthermie, second jour que les trypanosomes ont été détectés

M 4 = stabilat du 8<sup>e</sup> jour, deuxième jour de l'hyperthermie, premier jour où le sang était infectieux.

M 5 = stabilat du 8<sup>e</sup> jour, premier jour de l'hyperthermie; le sang était déjà infectieux au moins un jour auparavant.

M 6 = stabilat du 10<sup>e</sup> jour, premier (et seul) jour de l'hyperthermie; le sang n'était pas encore infectieux 2 jours auparavant.

Stabilats des moutons du début de l'accès *apparent* :

M 1 = stabilat du 14<sup>e</sup> jour, un jour avant l'hyperthermie, second jour que les trypanosomes ont été détectés au microscope.

M 2 = stabilat du 13<sup>e</sup> jour, deuxième jour de l'hyperthermie, premier jour de la parasitémie apparente.

M 3 = stabilat du 14<sup>e</sup> jour, deux jours avant l'hyperthermie, premier jour de la parasitémie apparente.

M 4 = stabilat du 12<sup>e</sup> jour, deux jours avant l'hyperthermie, 5 jours avant la parasitémie apparente, (premier jour où le sang était de nouveau infectieux après l'accès latent).

M 5 = stabilat du 15<sup>e</sup> jour, premier jour de l'hyperthermie, deux jours avant la parasitémie apparente.

M 6 = stabilat du 15<sup>e</sup> jour, premier jour de l'hyperthermie, second jour de la parasitémie apparente.

Stab. I à VII = les 7 stabilats de souris obtenus des glossines sans passer par les moutons.

☒ = absence de neutralisation.

◻ = neutralisation partielle.

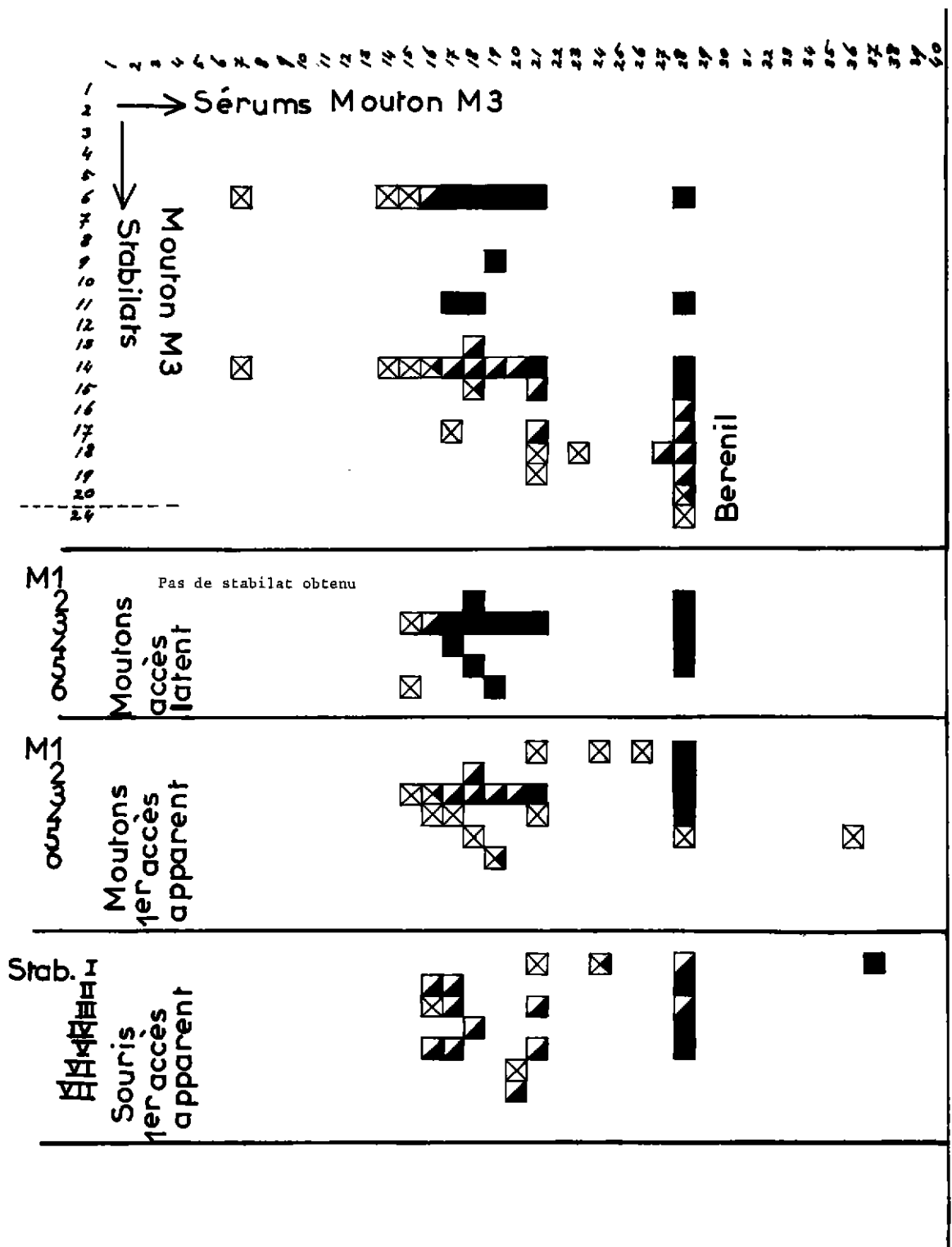
■ = neutralisation complète.

Dans quelques cas nous avons indiqué le degré de neutralisation partielle :

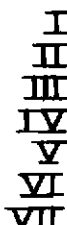







































































☒ = faible neutralisation partielle (mais réelle).

◻ = neutralisation presque complète.

N.B : Dans le tableau n° 4, nous avons réuni, pour plus de clarté, dans une même colonne les résultats obtenus sur les sérums du mouton M 3 des jours 17 à 21, étant donné que ces sérums neutralisent complètement le type de base, sans neutraliser complètement d'autres types testés.





SOURIS		MOUTONS		Sérums moutons									
				Stabliaps	accès latent	1 <sup>er</sup> accès apparent	Stab.	M1	M2	M3	M4	M5	M6
				Pas de stabilat obtenu									
Berenil													
Berenil													
Berenil													
Berenil													
Berenil													
Berenil													

## SUMMARY

## Immunological studies on trypanosomiasis

I. Antigenic types of a strain of *Trypanosoma congolense* Broden, 1904, after cyclical transmission

Experiments with sheep, rabbits, mice and *Glossina m. morsitans*, using a neutralization test, have shown in a strain of *Trypanosoma congolense* the existence of a basic antigenic type, reappearing after every cyclical transmission. This basic type is obtained by the subinoculation into mice of blood from the sheep during a short fever period that precedes the first microscopically patent parasitaemia, while the antigenic type of the latter has already changed and varies from sheep to sheep. The type isolated during the patent parasitaemia in mice following the injection of metacyclic trypanosomes does not belong to the basic antigenic type either, and varies from mouse to mouse.

Some observations are given on antigenic variation during the infection in sheep and the persistence of antibodies against the basic type; these antibodies may persist at a high level during at least 7 months.

## RESUMEN

## Estudios inmunológicos sobre las tripanosomiasis

I. Existencia de un tipo antigenico de base en una cepa de *Trypanosoma congolense* Broden, 1904, Variaciones después de la transmisión cíclica

Experimentaciones con ovejas, conejos, ratones y *Glossina m. morsitans*, utilizando una prueba de neutralización, demostró, en una cepa de *Trypanosoma congolense*, la existencia de un tipo antigenico de base, reapareciendo luego de cada transmisión cíclica. Se obtiene el dicho tipo de base por la subinoculación en ratones de sangre de las ovejas tomada durante un breve acceso térmico precediendo la primera parasitemia aparente en el microscopio, mientras ya ha cambiado y está variando de oveja a oveja el tipo antigenico de la primera parasitemia aparente.

El tipo aislado en el momento de la aparición en el microscopio de los parásitos en el ratón inoculado con tripanosomos metacíclicos ya no corresponde al tipo antigenico de base y varía de ratón a ratón.

Se dan algunas observaciones sobre las variaciones antigenicas durante la infección en las ovejas y sobre la persistencia de los anticuerpos contra el tipo de base; la tasa de estos anticuerpos puede quedar elevada durante siete meses por lo menos.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BROOM (J. C.) et BROWN (H. C.), Studies in trypanosomiasis. IV. Notes on the serological characters of *Trypanosoma brucei* after cyclical development in *Glossina morsitans*, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1940, **34**: 53-64.
2. BROWN (R. C.) et VICKERMAN (K.), Immunological aspects of the *in vitro* transformation of *Trypanosoma brucei*, *J. Protozool.*, 1970, **17** (3) suppl.: 23-24.
3. BROWN (K. N.) et WILLIAMSON (J.), The chemical composition of trypanosomes. IV Location of antigens in subcellular fractions of *Trypanosoma rhodesiense*, *Expl Parasit.*, 1964, **15**: 69-86.
4. CUNNINGHAM (M. P.) et GRAINGE (E. B.), The immune response of sheep infected with metacyclic *T. rhodesiense* and some studies on the antigenicity of the infecting organisms, *East Afr. Tryp. Res. Org., Rept.*, 1965: 28-30 (1966).
5. CUNNINGHAM (M. P.) et VAN HOEVE (K.), Neutralization of trypanosomes from infected rats by sera obtained from the same rats later in the infection, *East Afr. Tryp. Res. Org., Rept.*, 1962-1963: 21 et 23-24 (1963).
6. DAR (F. K.), GOEDBLOED (E.), LIGTHART (G. S.), MINTER (D. M.), PARIS (J.), WATAA-KA (S.) et WILSON (A. J.), Some results of isolation and serological typing of salivarian trypanosomes in East Africa. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1971, **65**: 250-251.
7. GRAY (A. R.), Antigenic variation in a fly-transmitted strain of *Trypanosoma brucei*, 9<sup>e</sup> Réunion Com. Sci. Int. Rech. Tryp. (C.C.T.A.), Conakry, 1962, 361-368.
8. GRAY (A. R.), The biological control of the antigenic characters of a strain of trypanosomes, 10<sup>e</sup> Réunion Com. Sci. Int. Rech. Tryp. (C.C.T.A.), Kampala, 1964: 55-59.
9. GRAY (A. R.), Antigenic variation in a strain of *Trypanosoma brucei* transmitted by *Glossina morsitans* and *G. palpalis*, *J. gen. Microbiol.*, 1965, **41**: 195-214.
10. GRAY (A. R.), Antigenic variation in clones of *Trypanosoma brucei*. I. Immunological relationships of the clones, *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1965, **59**: 27-36.
11. GRAY (A. R.), The antigenic relationship of strains of *Trypanosoma brucei* isolated in Nigeria, *J. gen. Microbiol.*, 1966, **44**: 263-271.
12. HARLEY (J. M. B.), The influence of the age of *G. morsitans* at the time of the infected meal on

- infection with *congolense* group trypanosomes, *East Afr. Tryp. Res. Org., Rept.*, 1968 : 70-71 (1969).
13. ITARD (J.) et MAILLOT (L.), Notes sur un élevage de glossines (*Diptera-Muscidae*) entrepris, à partir de pupes expédiées d'Afrique, à Maisons-Alfort (France), *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** : 29-44.
  14. LUMSDEN (W. H. R.), CUNNINGHAM (M. P.), WEBBER (W. A. F.), VAN HOEVE (K.) et WALKER (P. J.), A method for the measurement of the infectivity of trypanosome suspensions, *Expl. Parasit.*, 1963, **14** : 269-279.
  15. MAILLOT (L.), Essais de transmission cyclique de trypanosomes du groupe *congolense*, *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1970, **23** : 189-193.
  16. ROBERTS (C. I.), GRAY (M. A.) et GRAY (A. R.), Local skin reactions in cattle at the site of infection with *Trypanosoma congolense* by *Glossina morsitans* and *G. tachinoides*, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1969, **63** : 620-624.
  17. SEED (J. R.), Antigenic similarity among culture forms of the « *brucei* » group of trypanosomes, *Parasitology*, 1964, **54** : 593-596.
  18. SIMMONS (V.), CUNNINGHAM (M. P.), VAN HOEVE (K.) et LUMSDEN (W. H. R.), Investigations concerning the destination of intraperitoneal inocula in mice, *East Afr. Tryp. Res. Org., Rept.*, 1962-1963 : 25 (1963).
  19. SOLTYS (M. A.), Immunity in trypanosomiasis. I. Neutralization reaction, *Parasitology*, 1957, **47** : 375-389.
  20. UILENBERG (G.) et GIRET (M.), Antigenic types of a strain of *Trypanosoma congolense* after cyclical transmission, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* (Sous presse.) (12th Seminar on Trypanosomiasis, London, 30-9 - 1-10-71, Paper 28.)
  21. VAN HOEVE (K.) et CUNNINGHAM (M. P.), Some observations on the treatment of cattle with Berenil. 10<sup>e</sup> Réunion. *Com. Sci. Int. Rech. Tryp. (C.C.T.A.)*, Kampala, 1964 : 27-29.
  22. VAN HOEVE (K.) et CUNNINGHAM (M. P.), Prophylactic activity of Berenil against trypanosomes in treated cattle. *Vet. Rec.*, 1964, **76** : 260.
  23. VAN HOEVE (K.), CUNNINGHAM (M. P.) et GRAINGE (E. B.), The duration of anti-trypanosomal activity of serum from Berenil-treated cattle, *East Afr. Tryp. Res. Org., Rept.*, 1963-1964 : 65-66 (1965).
  24. VICKERMAN (K.), The surface coat of blood-stream trypanosomes, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1968, **62** : 463.
  25. VICKERMAN (K.), Functional aspects of the cytology of trypanosomes, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1970, **64** : 180-181.
  26. VICKERMAN (K.) et LUCKINS (A. G.), Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin conjugated antibody, *Nature, Lond.*, 1969, **224** : 1125-1126.
  27. WARD (R. A.) et BELL (L. H.), Susceptibility of *Glossina austeni* and *G. morsitans* to infection with *Trypanosoma congolense*, *Second Symposium Tsetse fly breeding*, Langford, Bristol, Sept. 1971 : Abstract n° 8.
  28. WATKINS (J. F.), Observations on antigenic variation in a strain of *Trypanosoma brucei* growing in mice, *J. Hyg., Camb.*, 1964, **62** : 69-80.
  29. WILSON (A. J.), Immunological studies of *Trypanosoma congolense* in infected cattle and on cyclical passage through *Glossina morsitans*, *J. Protozool.*, 1968, **15** (3) suppl. : 34.
  30. WILSON (A. J.) et CUNNINGHAM (M. P.), Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. II. Antigenic variation in a strain of *Trypanosoma congolense* transmitted by *Glossina morsitans*, *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1970, **64** : 818-821.
  31. WILSON (A. J.), Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. III. Patterns in the development of immunity, *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1971, **3** : 14-22.